

BC

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 1 月 30 日 (30.01.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/008455 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 19/00, C12N 15/62, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12Q 1/02, A01K 67/027, G01N 33/566

(MATSUDA, Michiyuki) [JP/JP]; 〒560-0002 大阪府豊中市緑丘3-11-2 1-301 Osaka (JP). 望月直樹 (MOCHIZUKI, Naoki) [JP/JP]; 〒565-0873 大阪府吹田市藤白台5-7-1 A-103 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/07270

(22) 国際出願日: 2002 年 7 月 17 日 (17.07.2002)

(74) 代理人: 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): US.

(30) 優先権データ:
特願2001-218756 2001 年 7 月 18 日 (18.07.2001) JP

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

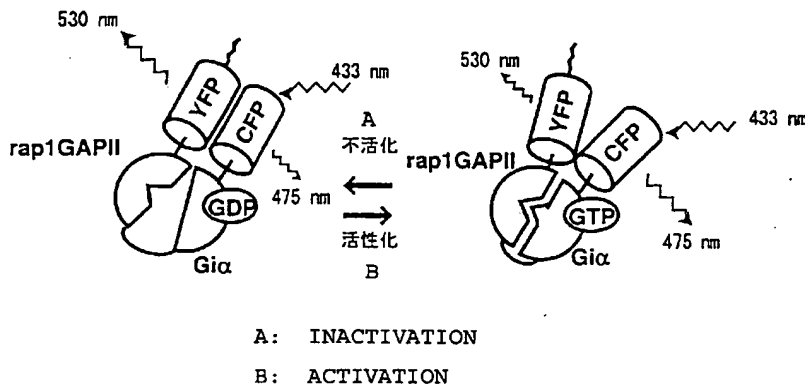
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松田 道行

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ACTIVITY MONITOR MOLECULES FOR G-PROTEIN TRIMER

(54) 発明の名称: 三量体型G蛋白質の活性モニター分子



(57) Abstract: Fused polypeptides serving as monitor molecules for measuring the quantitative ratio of the GTP-binding type to the GDP-binding type in a G-protein trimer in cells wherein at least the following polypeptides (a) to (d) are ligated together: (a) a polypeptide having the full amino acid sequence or a part of the same of the trimer G-protein α -subunit, or a variant amino acid sequence thereof; (b) a polypeptide

having the full amino acid sequence or a part of the same of a target protein to which the activated G-protein trimer α -subunit is bound, or a variant amino acid sequence thereof; (c) a polypeptide having the full amino acid sequence or a part of the same of a fluorescent acceptor protein, or a variant amino acid sequence thereof; and (d) a polypeptide having the full amino acid sequence or a part of the same of a fluorescent donor protein, or a variant amino acid sequence thereof.

[続葉有]

WO 03/008455 A1



(57) 要約:

この出願の発明は、細胞内の三量体型 G 蛋白質の GTP 結合型と GDP 結合型の量比を測定するためのモニター分子として、少なくとも以下の (a) ~ (d) のポリペプチド: (a) 三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド; (b) 活性化した三量体型 G 蛋白質 α サブユニットが結合する標的蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド; (c) 蛍光アクセプター蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド; および (d) 蛍光ドナー蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド、が連結した融合ポリペプチドを提供する。

明細書

三量体型 G 蛋白質の活性モニター分子

5

技術分野

この出願の発明は、三量体型 G 蛋白質の活性化を *in vivo* および *in vitro* で測定するためのモニター分子に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、
10 活性モニター分子を作成するためのポリヌクレオチド、活性モニター分子を細胞内
や動物個体内に導入するための遺伝子操作材料、および活性モニター分子を用いて
三量体 G 型蛋白質の活性化を生細胞において測定する方法に関するものである。

15

背景技術

細胞内情報伝達分子には非常に多くの種類が知られており、三量体型 G 蛋白質は
その中でも種類が多いこと、様々な細胞表面受容体の細胞内ドメインに結合し、神
経系や内分泌系などで重要な分子スイッチとして働いていることから非常に詳しく
20 解析されてきている（文献 1-3）。三量体型 G 蛋白質群は Gs、Gi/Go、G12、G13、
Golf などからなる。これら三量体型 G 蛋白質は、細胞増殖、細胞骨格、細胞内輸送、
核輸送など細胞内での多様な情報伝達を制御する重要な分子スイッチである。三量
体型 G 蛋白質は、 α 、 β 、 γ の 3 つのサブユニットからなることがその名前の由来
であるが、実際には α と β γ の二つのサブユニットとして機能している。このうち、
25 α サブユニットはグアノシン 5' -二リン酸（guanosine 5' -diphosphate:GDP）に結
合している不活性化型と、グアノシン 5' -三リン酸（guanosine 5' -
triphosphate:GTP）に結合している活性化型との間をサイクルしている（図 1 参
照）。GTP 結合型はそれぞれの α サブユニットに特異的な標的分子に結合し、活性化
する。三量体型 GDP 結合型を GTP 結合型にする反応を触媒する蛋白質がグアニンヌ
30 クレオチド交換因子、GTP 結合型を GDP 結合型に戻す分子が GTP 水解促進酵素である。

通常、細胞表面受容体がグアニンヌクレオチド交換因子として作用し、リガンド依存性に三量体型 G 蛋白質の α サブユニットを GTP 結合型に変換させる。

最近、多くの三量体型 G 蛋白質およびその活性化因子と不活性化因子が単離されるにおよび、これら三量体型 G 蛋白質が細胞内および個体内でどのような機能的差異があるのかに注目が集まっている。その機能的差異を明らかにするためには、細胞内および個体内での三量体型 G 蛋白質の活性化状態をモニターする必要がある。また、三量体型 G 蛋白質に結合している 7 回膜貫通型受容体にはヒトだけでも 1000 種類以上があると言われており、これらは、それぞれが細胞内の様々な事象をコントロールしている。実際に、これらの受容体の中には既に、癌や高血圧などに関連することが知られているものもある。今後、様々な疾患に対する薬剤スクリーニングの標的分子として三量体型 G 蛋白質が重要となるものと考えられる。そして、これら三量体型 G 蛋白質の活性を制御する薬剤を生細胞でスクリーニングするためにも、三量体型 G 蛋白質の簡便かつ正確な活性モニターは不可欠である。さらには、そのようなモニターを生体内で行うことは、三量体型 G 蛋白質の活性化の異常に起因する疾病群の診断にも有用である。

細胞内での三量体型 G 蛋白質の活性化の程度を調べるには、細胞内での三量体型 G 蛋白質の GTP 結合型と GDP 結合型の量比を知る必要がある。しかしながら、生細胞内での三量体型 G 蛋白質の GTP 結合型と GDP 結合型の量比を調べる方法はこれまで全く知られていなかった。ある特定の三量体型 G 蛋白質が、特定の生命現象に関与するか否かのこれまでのデータは、ほとんど全てを、コレラトキシンや百日咳毒素などの、三量体型 G 蛋白質に対する阻害剤を用いて調べたものと、活性化あるいは非活性化型の三量体型 G 蛋白質を共発現させることによって得られている。

25

一方、生細胞において蛋白質を可視化する技術としては緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescent protein: GFP) を用いる方法が知られている。GFP は発光クラゲより単離された蛋白質であり、緑色の蛍光を発し、現在、細胞内での蛋白質の局在を調べるのに広く用いられている。GFP を改良した蛋白質として EGFP、ECFP、EYFP、EBFP などがあ

30

放出する。

さらに GFP を応用した技術として、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescent resonance energy transfer: FRET) という現象を利用した蛍光測定が知られている (文献 4-6)。FRET とは、下記の現象を指す。蛍光物質 A および B が、それぞれ λ_{aex} および λ_{bex} の波長の光で励起され、 λ_{aem} および λ_{bem} の波長の蛍光を発するとする。この時、物質 A および B がごく近傍に存在し、 λ_{aem} が λ_{bex} に十分に近い時、物質 A および B の混合物に λ_{aex} の光を照射すると、物質 A のエネルギーが B に吸収され λ_{bem} の蛍光が観察される。これを FRET という。この方法を利用して、2 分子間の距離を推定することもできる。この時、蛍光物質 A をドナー、蛍光物質 B をアクセプターという。

さらにこの技術の応用として、二つの蛍光物質を一つの蛋白質内に標識することにより、蛋白質の構造変化を検出することが可能である。EBFP および EGFP、ECFP および EYFP の 2 セットの GFP 関連蛋白質は、至適な FRET のためのドナーとアクセプターの組み合わせを作ることが知られている。EBFP と EGFP との二つの蛋白質とカルシウム結合蛋白質カルモジュリンとの融合蛋白質で、この FRET 技術を応用してカルシウムの濃度を測りうるということが知られている。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞内における三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの GTP 結合型と GDP 結合型の量比を測定するための手段と、この手段を用いた測定方法を提供することを課題としている。

25

発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するための発明として、少なくとも以下の (a) ~ (d) のポリペプチド：

(a) 三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド；

30

- (b) 活性化した三量体型 G 蛋白質 α サブユニットが結合する標的蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド；
- (c) 蛍光アクセプター蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド；および
- 5 (d) 蛍光ドナー蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド、
- が連結した融合ポリペプチドである三量体型 G 蛋白質の活性モニター分子を提供する。

- 10 この発明において、「ポリペプチド」とは、30 個以上のアミノ酸残基からなるペプチドであって、それぞれの蛋白質と実質的に同一の機能を有するペプチドを意味する。蛋白質それ自体であってもよく、化学合成したものであってもよい（以下、各ポリペプチドは、それらが由来する蛋白質の名称として記載することがある）。
- また、「全部のアミノ酸配列」とは、それぞれの蛋白質を構成する全アミノ酸残基
- 15 からなるアミノ酸配列を意味する。「一部のアミノ酸配列」とは、蛋白質の活性中心を含む一部アミノ酸配列を意味し、具体的には、各アミノ酸配列におけるアミノ末端側またはカルボキシル末端側の少なくとも 1 アミノ酸残基を欠失したポリペプチドである。さらに、「変異アミノ酸配列」とは、蛋白質の活性を損なわない範囲で、あるいは蛋白質の活性を向上させるように、1 以上のアミノ酸残基が付加また
- 20 は欠失、若しくは他のアミノ酸残基によって置換されているアミノ酸配列を意味する。

- この発明の活性モニター分子においては、連結したポリペプチド (a) - (b) の一端にポリペプチド (c) が、他端にポリペプチド (d) が連結していることを好ましい態様
- 25 の一つとしている。

この発明の活性モニター分子においては、各ポリペプチド間の少なくとも一箇所がスパーサーペプチドを介して連結していることを好ましい態様の一つとしている。

- 「スパーサーペプチド」とは、3 ~ 100 個、好ましくは 5 ~ 15 個のアミノ酸残基か
- 30 らなるペプチドであって、各ポリペプチドを一定の距離をもって連結するための

「スペーサー」として機能する。

この発明の活性モニター分子は、さらに以下のポリペプチド：

(e) 細胞内局在シグナルとして機能するポリペプチド

- 5 を連結していることを好ましい態様の一つとしている。「細胞内局在シグナル」とは、この発明の活性化モニター分子を細胞の核内または幕内に局在化させることのできるアミノ酸配列を意味する。このポリペプチド (e) は、前記ポリペプチド (a) ～ (d) からなる活性モニター分子のアミノ末端側および／またはカルボキシル末端側に連結される。

10

さらにこの発明の活性モニター分子においては、蛍光アクセプター蛋白質および蛍光ドナー蛋白質が、それぞれ GFP アクセプター蛋白質および GFP ドナー蛋白質であることを好ましい態様の一つとしている。

- 15 この出願の発明はまた、前記の活性モニター分子をコードするポリヌクレオチドを提供する。この「ポリヌクレオチド」とは、前記の活性モニター分子を構成するアミノ酸配列をコードする DNA 鎖または RNA 鎖である。

- 20 この出願の発明はさらに、前記のポリヌクレオチドを保有するベクターを提供する。このベクターは、具体的には、前記のポリヌクレオチドによる組換えプラスミドまたは組換えウイルスである。これらのベクターは、例えば、*in vitro* 翻訳または培養細胞もしくは動物個体内細胞において前記の活性モニター分子を発現することのできる発現ベクターである。

- 25 さらに、この出願の発明は、前記ベクターによる形質転換体であって、活性モニター分子を発現する細胞と、前記のポリヌクレオチドをゲノム DNA に保有し、活性モニター分子を体細胞で発現するトランスジェニック動物を提供する。

- 30 またさらに、この出願の発明は、前記の活性モニター分子を細胞内に導入し、その活性モニター分子の発する蛍光を測定することを特徴とする三量体型 G 蛋白質の

活性化測定方法を提供する。

この測定方法においては、活性モニター分子が導入された細胞が、前記の形質転換細胞であること、または前記のトランスジェニック動物の細胞であることをそれぞれ好ましい態様としている。

図面の簡単な説明

図 1 は、三量体型 G 蛋白質の活性制御を例示した模式図である。Gi α 蛋白質を例にとり、三量体型 G 蛋白質の活性制御機構を模式的に示してある。三量体型 G 蛋白質は GDP に結合していると不活性化型であり、ここにグアニンヌクレオチド交換因子が作用すると GDP が GTP に置換され、活性化型となる。活性化された G 蛋白質は構造変化を起し、標的分子と結合し活性化できるようになる。活性化された G 蛋白質は GTP 水解促進酵素存在下に GTP を GDP に水解し、もとに不活性化型に戻る。

図 2 は、FRET を利用した三量体型 G 蛋白質の活性測定法の原理である。この図では三量体型 G 蛋白質としてラット G α i2 を標的蛋白質として rap1GAP11 を例にとっている。CFP (Cyan fluorescent protein) は 433 nm の光で励起され、475 nm を極大とする光を放射する。一方、YFP (Yellow fluorescent protein) は 505 nm の光で励起され 530 nm を極大とする光を放射する。図に示すモニター分子の場合には、刺激前には、N 末側に存在する YFP と C 末側に存在する CFP とが接近しているので CFP から YFP へのエネルギーの移行と、それに伴う YFP からの 530 nm の蛍光が観察されるようになる。ところが、刺激をいれてラット G α i2 が活性化型になると、標的分子 rap1GAP11 のラット G α i2 結合領域 (RBD) に結合するので、YFP と CFP が離れて、その結果、CFP から YFP へのエネルギーの移行はあまり起きなくなる。

図 3 は、プラスミド pGaichu の構造。発現ベクターはすでに報告されている pCAGGS を用いた。この CAG プロモーターの下流に YFP-rap1GAP11 (G α i2 結合領域) -G α i2-CFP の順となる融合蛋白質の cDNA を結合する。

図 4 は、Gaichu-WT と Gaichu-QL との蛍光プロフィール。293T 細胞に pGaichu-WT あるいは pGaichu-QL とをリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、48 時間後に

細胞を可溶化し、遠心して上清を得た。上清を励起波長 433 nm にて分光光度計にて解析した。

図 5 は、Gaichu-WT を用いた生細胞でのラット $G\alpha i2$ 活性化の測定。COS7 細胞に pGaichu-WT をトランスフェクトし 48 時間後に、スフィンゴシン 1 リン酸で刺激する。

- 5 赤く表される部位が蛍光強度比 2 以上の点である。細胞内で $G\alpha i$ の活性化が増加していることを示している。

発明を実施するための最良の形態

10

この発明の活性モニター分子は、活性化した三量体型 G 蛋白質 (GTP 結合型三量体型 G 蛋白質) のみがその標的分子に結合することを利用して、三量体型 G 蛋白質の活性化をモニターする。

- 15 すなわち、この発明の活性モニター分子は少なくとも、活性化した場合には標的蛋白質と結合する三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a)、標的蛋白質 (b)、蛍光ドナー蛋白質 (c)、および蛍光アクセプター蛋白質 (d) とからなっている。この構造により、三量体型 G 蛋白質が GTP に結合して活性化されると、モニター分子内で三量体型 G 蛋白質と標的蛋白質とが結合し、それにより、蛍光ドナー蛋白質と蛍光アクセプター蛋白質の FRET 効率が変化する。
- 20

- 三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a)、標的蛋白質 (b)、蛍光ドナー蛋白質 (c) および蛍光アクセプター蛋白質 (d) の連結の順序は、(a) と (b) との結合による FRET 変化を観察することができる順序であれば特に制限は無いが、連結した (a)-(b) の一端に (c) を、他端に (d) を連結することが好ましい。具体的には、アミノ末端側より、(c)-(a)-(b)-(d) ; (d)-(a)-(b)-(c) ; (c)-(b)-(a)-(d) ; または (d)-(b)-(a)-(c) である。このような連結順序を有するモニター分子の場合、GDP 結合型 G 蛋白質 α サブユニット (a) が、グアニンヌクレオチド交換因子の作用によって GTP 結合型へと活性化すると、それに近接する標的蛋白質 (b) に結合し、その結果、モニター分子の両端
- 25
- 30 に位置する蛍光ドナー蛋白質 (c) および蛍光アクセプター蛋白質 (d) の距離が変化する。

て FRET 効率が変化する (図 2)。一方、GTP 結合型の活性化 G 蛋白質 (a) に GTP 水解促進酵素が作用して不活性の GDP 結合型 G 蛋白質に変化すると、それまで結合していた標的蛋白質 (b) が G 蛋白質 (a) から解離し、蛍光ドナー蛋白質 (c) と蛍光アクセプター蛋白質 (d) の距離が変化するため、FRET 効率は変化する。すなわち、この発明の

5 モニター分子は、三量体 G 蛋白質の GDP 結合型から GTP 結合型への変化 (活性化) と、GTP 結合型から GDP 結合型への変化 (非活性化) の両方を測定することができる。なお、標的蛋白質および三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの種類および長さにより、活性化に伴って FRET 効率が上昇する場合と、減少する場合とがありうる。

- 10 三量体型 G 蛋白質としては、Gs、Gi、Go、Gq、Gt、Golf 等のサブファミリーを用いることができるが、Gi および Go サブファミリーを用いることが好ましい。また、三量体型 G 蛋白質の α サブユニットとしては $G\alpha s1$ 、 $G\alpha i1$ 、Go、G12 等が知られているが、Gi サブファミリーの場合には $G\alpha i2$ が好ましい。
- 15 標的蛋白質としては、rap1GAP11、RGS12、LGN、RGS14 等が知られており、これらの蛋白質を適宜に選択して用いることができるが、三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a) として $G\alpha i2$ を用いる場合には、rap1GAP11 を標的蛋白質 (b) とすることが特に好ましい。
- 20 蛍光蛋白質としては、GFP を使用することができる。また最近、オワンクラゲ以外の生物にも GFP 様の蛍光蛋白質が存在することが知られるようになり、それらの遺伝子が次々に単離されている。なかでも、DaRed (クロンテック社) はこれまでの GFP よりも長波長側にて励起され、赤色領域の蛍光を発する。従って、この発明においては、これらの様々な蛍光蛋白質やその遺伝子 (cDNA 等) を利用することができる。
- 25 なお、GFP としては EGFP、ECFP、EYFP、EBFP 等が知られているが、GFP ドナー (c) としては ECFP が、GFP アクセプター (d) としては EYFP が好ましく用いられる。

すなわち、この発明のモニター分子の特に好ましい態様は、アミノ末端側より、GFP ドナー (c)、 $G\alpha i2$ (a)、rap1GAP11 (b)、GFP アクセプター (d) からなる構造である。

- なお、三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a) は、その標的蛋白質 (b) に結合することができれば、全長である必要はない。むしろ、アミノ末端側あるいはカルボキシル末端側を削除することで、しばしば FRET 効率の増加が期待できる。また、標的蛋白質 (b) も、三量体型 G 蛋白質 α サブユニットに結合する領域が含まれていれば全長である必要はない。蛍光ドナー蛋白質 (c) および蛍光アクセプター蛋白質 (d) も、FRET のペアーとなる機能が保たれていれば全長である必要はなく、あるいは変異を有していてもよい。しばしば、これら蛍光蛋白質のカルボキシル末端側を短くすることにより、FRET 効率の増加が期待できる。
- 10 三量体型 G 蛋白質 α サブユニットあるいはその標的蛋白質に変異を導入することにより、グアニンヌクレオチド交換因子や GTP アーゼ活性化因子に対する感受性を向上させることができ、それによってモニター分子のダイナミックレンジを変化させることができる。
- 15 さらにこの発明のモニター分子は、三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a)、標的蛋白質 (b)、蛍光ドナー蛋白質 (c) および蛍光アクセプター蛋白質 (d) のそれぞれの間を、スパーサーペプチドを介して結合することができる。このスパーサーペプチドの存在によって、例えば、三量体型 G 蛋白質 α サブユニット (a) が活性化した場合にのみ標的蛋白質 (b) と結合できるような両者の適切な柔軟性が保たれる。
- 20 またさらに、この発明の活性モニター分子は、そのアミノ末端側またはカルボキシル末端側、あるいはその両側に他の蛋白質あるいはペプチドを連結するようにしてもよい。特に、細胞内局在シグナル（たとえば核内移行シグナル、細胞膜局在シグナル等）を付加することにより、細胞内の局所での三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの GTP/GDP 比を測定することもできる。あるいはまた、HIV-TAT 配列等の細胞内移行シグナルを付加することによって、モニター分子を細胞外から細胞内に導入することもできる。
- 25 以上のおりの活性モニター分子は、個々の蛋白質またはポリペプチドをそれぞれ公知の方法によって連結することによって作成することもできるが、好ましくは、
- 30

後記のポリヌクレオチドを *in vitro* 転写するか、または適当な宿主-ベクター系で発現させることによって作成することができる。

この発明のポリヌクレオチドは、活性モニター分子を構成する各蛋白質をコードするポリヌクレオチド（例えば、cDNA）を、制限酵素とリガーゼを用いた公知の方法によって順次に連結することにより作成することができる。個々の cDNA は、既存の cDNA クローンを鋳型として PCR 増幅する等の方法によって多量に調製することができる。あるいはまた、後記実施例に示したように、連結する蛋白質のそれぞれの cDNAs を鋳型とする PCR によって、連結した蛋白質（キメラ蛋白質）をコードするポリヌクレオチドを得ることができる。また、PCR の際に、PCR プライマーに「スペーサーペプチド」をコードする配列を含めれば、スペーサーペプチドによって連結された蛋白質を発現するポリヌクレオチドを得ることができる。

この発明のベクターは、前記のポリヌクレオチドを *in vitro* 翻訳、または適当な宿主細胞で発現することのできるベクターである。

活性モニター分子を *in vitro* 翻訳で発現させる場合には、前記のポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して組換えベクターを作製することができる。このベクターを、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などの *in vitro* 翻訳系に添加すれば、活性モニター分子を *in vitro* で生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

25

活性モニター分子を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成する。この発現ベクターで宿主細胞を形質転換すれば、モニター分子を発現する形質転換体細胞を得ることができる。また、得られた形質転換体を培養

30

すれば、この発明の活性モニター分子を微生物内で大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

- 5 さらに、活性モニター分子を真核細胞で発現させる場合には、前記ポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ (A) 付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成する。このベクターを真核細胞内に導入すれば、モニター分子を発現する形質転換真核細胞を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓由来細胞
10 HEK293T、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巢細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、
15 DEAE デキストラン法など公知の方法を用いることができる。

- 形質転換細胞で発現させたモニター分子を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせで行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、
20 ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

- この発明のトランスジェニック動物は、活性モニター分子をコードする前記ポリ
25 ヌクレオチドを導入した全能性細胞を個体発生させて得られる非ヒト動物およびその子孫動物であって、細胞染色体中に上記ポリヌクレオチドを保有し、体細胞において活性モニター分子を高レベルで産生することを特徴とする動物である。この発明のトランスジェニック動物は、公知のトランスジェニック動物作製法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384, 1980）に従って作成することができる。
30 すなわち、前記のポリヌクレオチド（以下、「導入遺伝子」と記載することがあ

る)を非ヒト動物の全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニック動物を作製することができる。非ヒト動物としては、技術的には全ての動物種を対象とすることが可能であるが、特に近交系が多数作出されており、
5 しかも受精卵の培養、体外受精等の技術が整っているマウスが最適である。

また、導入遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。このプロモーター／エンハンサー配列の選択によって、活性モニター分子を全身性に発現させることもでき、また特定の組織で選択的に発現さ
10 せることもできる。

このような導入遺伝子は、前記のポリヌクレオチドやプロモーター／エンハンサー配列を、導入遺伝子の発現調節に有効な位置関係となるように環状 DNA ベクターに挿入連結することによって構築することができる。そして、このベクターを開裂
15 して直鎖状にした後、全能性細胞に導入する。

遺伝子を導入する全能性細胞としては、マウスの場合、受精卵や初期胚を用いることができる。また培養細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック動物
20 個体の産出高率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNA の物理的注入（マイクロインジェクション）法が最適である。

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（マウスの場合には、例えば、尾部先端）から DNA を抽出し、サザン解析や PCR 法により導入遺伝子の存在を確認す
25 る。導入遺伝子の存在が確認された個体を初代（Founder）とすれば、導入遺伝子はその子（F1）の 50%に伝達される。さらに、この F1 個体を野生型動物または他の F1 動物と交配させることにより、2 倍体染色体の片方（ヘテロ接合）または両方（ホモ接合）に導入遺伝子を有する個体（F2）を作成することができる。

30 このようにして作出されたトランスジェニック動物は、全ての体細胞または特定

の組織において活性モニター分子を発現することができる。

この発明の活性化測定方法は、前記の活性モニター分子を細胞内に導入し、その活性モニター分子の発する2色の蛍光を測定し、その比を活性化の指標とすること
5 を特徴としている。

モニター分子を細胞内に導入するには、例えば、細胞内移行シグナル等を付加したモニター分子を用いてモニター分子を直接細胞内に導入することができる。あるいは、モニター分子をコードするポリヌクレオチドを保有するベクターを細胞に導
10 入し、ポリヌクレオチドからモニター分子を発現させることによって細胞内にモニター分子を導入することもできる。さらに、前記のトランスジェニック動物の細胞はモニター分子を産生しているため、このトランスジェニック動物の細胞を対象としてG蛋白質の活性化を測定することもできる。

15 モニター分子を導入した細胞における蛍光測定は、例えば、分光光度計を用いて行うことができる。すなわち、モニター分子を導入した（発現する）細胞を可溶化し、蛍光プロフィールを作成する。細胞の可溶化の方法に特に制限はないが、界面活性剤 TritonX100 を含む溶液が好ましい。可溶化した溶液に蛍光ドナーに対する励起光を照射し、蛍光プロフィールを公知の分光光度計を用いて測定する。蛍光ドナ
20 ーの励起光と蛍光アクセプターの励起光との量比を取り、蛍光ドナーから蛍光アクセプターへの FRET 効率を測定する。この FRET 効率の変化から、モニター分子の構造変化（すなわち、G蛋白質の活性化または非活性化）を検出することができる。

蛍光測定は、顕微鏡を用いても測定することができる。すなわち、モニター分子
25 を導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察する方法を採用することもできる。用いる蛍光顕微鏡には特に制限はないが、公知のキセノン光源を有する倒立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss, Axiovert 100）に回転式蛍光励起フィルターおよび回転式蛍光発光フィルターを備え、高感度冷却 CCD カメラを備えたものが好ましい。さらにフィルターおよびカメラ画像は、日本ローパー社製 Metamorph 画像解析ソフトにてコント
30 ロールならびに解析できるシステムを望ましい。細胞に蛍光ドナーの励起光を照射

し、蛍光ドナーの蛍光波長での画像を CCD カメラにより撮影し、ついで、蛍光アクセプターの蛍光波長での画像を撮影する。ついでこの両者の蛍光強度の比を測定することにより各測定点での FRET の効率が測定でき、この時点での三量体型 G 蛋白質の GTP/GDP 比を解析することができる。

5

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

10

実施例

この発明の活性モニター分子を用い、三量体型 G 蛋白質 $G\alpha i$ サブユニットの活性化を測定した。

15

実施例 1

$G\alpha i2$ と rap1GAP11 のキメラ蛋白質をコードする

ポリヌクレオチド (DNA 鎖) の作成:

1.1 $G\alpha i2$ cDNA の増幅:

20 ラット $G\alpha i2$ の cDNA (Genbank/EMBL: M12672) を鋳型に、センスプライマー-Gi5F (5' -GGTGGCGGATCCGGTACGCGTGCCGAGGACAAGGCGGCAGCCGAG-3' : 配列番号 1)、アンチセンスプライマー-Gi3Not (5' -GCGGCCGCCGAAGAGGCCACAGTCCTTCAGG-3' : 配列番号 2) と、耐熱性 DNA 複製酵素 Pfx (Gibco-BRL, Betesda, U. S. A.) とを用いた通常の PCR (polymerase chain reaction) 法により、ラット $G\alpha i2$ のアミノ酸 1 番から 355
25 番までに対応する cDNA を増幅した。センスプライマー-Gi5F は下線部で示したスパーサー配列を 5' に有し、それに引き続いてラット $G\alpha i2$ のアミノ酸 7 番から 14 番までに対応する cDNA 配列を有している。一方、アンチセンスプライマー-Gi3Not は下線部で示した制限酵素 NotI の切断部位と、ラット $G\alpha i2$ のアミノ酸 349 番から 355 番までに対応する cDNA 配列の相補鎖配列を有している。

30

1.2 変異型 $G\alpha i2$ cDNA の作成 :

PCR ムタゲネーシスにより、アミノ酸 205 番のグルタミンをロイシンに置換した変異型ラット $G\alpha i2$ cDNA を、1.1 と同様に増幅した。

5 1.3 rap1GAP11 cDNA の増幅 :

ヒト rap1GAP11 蛋白質 cDNA (DDBJ/EMBL/Genbank: AB003930) を鋳型に、センスプライマー-rap1GAP11-Sal (5' -GTCCGACATGGCAGCTGCGGCCGCG- 3' : 配列番号 3)、アンチセンスプライマー-rap1GAP11-R (5' -

ACGCGTACCGGATCCGCCACCGGATCCGCCACCGGATCCGCCGGTACCACCTCCGGAGCCTGTGGGGTTGCACTC
10 GAGCTT-3' : 配列番号 4) と、耐熱性 DNA 複製酵素 Pfx とを用いた通常の PCR 法により、rap1GAP11 のアミノ酸 1 番から 117 番までに対応する cDNA を増幅した。センスプライマー-rap1GAP11-Sal は下線部で示した制限酵素 SalI の切断部位と、ヒト rap1GAP11 のアミノ酸 1 番から 7 番までに対応する cDNA 配列を有している。一方、アンチセンスプライマー-rap1GAP11-R は下線部で示したスパーサー配列と、ヒト
15 rap1GAP11 のラット $G\alpha i2$ 結合領域のカルボキシル末端側 (アミノ酸 111 番から 117 番まで) に対応する cDNA 相補鎖配列を有している。

1.4 ラット $G\alpha i2$ とヒト rap1GAP11 のキメラ蛋白質をコードする DNA 鎖の増幅 :

1.1 および 1.2 でそれぞれ増幅した cDNA と 1.3 で増幅した cDNA とを混合したもの
20 を鋳型とし、センスプライマー-rap1GAP11-Sal (配列番号 3) およびアンチセンスプライマー-Gi3Not (配列番号 2) と、Pfx とを用いた通常の PCR 法により、ヒト rap1GAP11 とラット $G\alpha i2$ のキメラ蛋白質をコードする DNA 断片を増幅した。得られた DNA 断片は pCR-bluntII-TOPO (Invitrogen 社) にライゲーションし、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌より通常のアルカリ SDS 法によりプラスミドを精
25 製した。

1.5 EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) および ECFP (enhanced cyan fluorescent protein) を発現するベクター-pFret2 の構築 :

30 1.6 pCAGGS-P7 の構築 :

1. 6. 1 pBluescript-SKII (+) (Stratagene 社) のマルチプルクローニングサイトをプライマーP7 (5' -CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3' : 配列番号 5) とプライマーP8 (5' -AGCGGATAACAATTTACACAGGAAAC-3' : 配列番号 6) を用いて増幅した。

1. 6. 2 哺乳類細胞発現ベクターpCAGGS (文献 7) を EcoRI で切断し、Klenow 酵素で平滑末端化したのち、1. 6. 1 で増幅した DNA 断片を T4DNA リガーゼで結合した。以下、このベクターを pCAGGS-P7 と記載する。

1. 7 EGFP および EYFP の作成 :

GFP (Genbank/EMBL: P42212) に公知の変異を PCR で導入して作成した。

10

1. 8 EYFP の増幅 :

EYFP-V68L/Q69K の cDNA を鋳型に、センスプライマー-MyrXFPP (5' -
GGCGAATTCGCCATGGGCAGCAACAAGAGCAAGCCCAAGGACGCCAGCCAGCGGGGCATGGTGAGCAAGGGCGAG
-3' : 配列番号 7)、アンチセンスプライマー-GFP-N3 (5' -
15 GGATCCGGTACCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG-3' : 配列番号 8) と、耐熱性 DNA 複製酵素
Pfx とを用いた通常の PCR 法により、EYFP の全アミノ酸に対応する cDNA を増幅した。
センスプライマー-MyrXFPP は 5' に EcoRI の制限酵素部位を有し、下線部で示したミ
リスチン化シグナルをコードするマウス N-Src (DDBJ/EMBL/GenBank : M17031) の配
列を有する。一方、アンチセンスプライマー-GFP-N3 は下線部で示した制限酵素
20 BamHI、KpnI、および XhoI の切断部位を 5' に有し、ECFP のカルボキシル末端側の
相補鎖の配列を有している。増幅した DNA を pCR-bluntII-TOPO (Invitrogen 社) に
ライゲーションし、大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌より通常のアルカ
リ SDS 法によりプラスミドを精製した。

25 1. 9 ECFP の増幅 :

ECFP の cDNA を鋳型に、センスプライマー-XFPNot2 (5' -
GCGGCCGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC -3' : 配列番号 9)、アンチセンスプライマー-XFP
-BglI (5' -AGATCTACAGCTCGTCCATGCCGAGAG-3' : 配列番号 10) と、耐熱性 DNA 複製酵
素 Pfx とを用いた通常の PCR 法により、ECFP の全アミノ酸に対応する cDNA を増幅し
30 た。センスプライマー-XFPNot2 は下線部で示した制限酵素 NotI の切断部位を 5' に

有する。一方、アンチセンスプライマーXFP-Bgl は下線部で示した制限酵素 BglII の切断部位を 5' に有し、ECFP のカルボキシル末端側の相補鎖の配列を有している。

1.10 pFret2-Myr の構築 :

- 5 pCAGGS-P7 を制限酵素 EcoRI で切断した。1.5 で準備したプラスミドを EcoRI で処理し、EYFP 断片を得た。この二つの断片を T4DNA リガーゼで結合し、得られたプラスミドを、NotI と BglII で切断し、1.5 で得た ECFP 断片を NotI と BglII で切断したものと T4DNA リガーゼで結合した。以下、得られたプラスミドを pFret2-Myr と記載する。

10

1.11 ラット G α i2 活性モニター分子の発現プラスミド pGaichu の作成 :

- pFret2-Myr を XhoI と NotI で切断し、この切断部位に 1.4 で得られたキメラポリヌクレオチドを SalI/NotI で切断したものを T4DNA リガーゼで結合し、プラスミド pGaichu-WT および pGaichu-QL を得た。pGaichu-WT の構造を図 3 に、核酸配列を配
15 列番号 11 にそれぞれ示す。また、pGaichu-WT が発現するモニター分子のアミノ酸配列を配列番号 1 2 に示す。

実施例 2

20

哺乳類細胞での発現、分光光度計による解析

- 2.1 ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞は 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地（日水製薬）で培養した。
- 25 2.2 HEK293T 細胞に、pGaichu をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。48 時間後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水にて洗浄した後、溶解液（20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100）にて溶解した。溶解液を 10000 x g で遠心し上清を回収した。
- 30 2.3 上清を分光光度計（日本分光 FP-750）の 1 ml キュベットにて解析した。励起

波長 433 nm にて、450 nm から 550 nm までの蛍光強度を測定した（図 4）。

実施例 3

5 哺乳類細胞での発現、タイムラプス蛍光顕微鏡にての解析

3. 1 サル腎臓由来 COS7 細胞は 10%ウシ胎児血清を含むフェノールレッド不含 MEM 培地（日水製薬）で培養した。

10 3. 2 COS7 細胞に、pGaichu をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトし、48 時間後に観察した。

3. 3 キセノン光源を有する倒立型蛍光顕微鏡（Carl Zeiss, Axiovert 100）に回転式蛍光励起フィルターおよび回転式蛍光発光フィルター装置（LUDL electronic 社）
15 を備え、高感度冷却 CCD カメラ（Photometrix 社、Micromax450）を備え、日本ローバ一社製 Metamorph 画像解析ソフトにてコントロールならびに解析できるシステムを用いた。励起フィルター、蛍光フィルター、ダイクロイックミラーはオメガ社より購入した。細胞に 430 nm の励起光を照射し、475 nm の CFP ドナーの蛍光波長での画像を CCD カメラにより撮影し、ついで、530 nm の YFP アクセプターの蛍光波長での
20 画像を撮影した。ついでこの両者の蛍光強度の比を測定することにより各測定点での FRET の効率を測定した（図 5）。

参考文献

25

1. Hepler, J. R. and Gilman, A. G. 1992. G proteins. Trends Biochem Sci. 1992 Oct;17(10):383-7.
2. Bourne, H. R. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. Curr Opin Cell Biol 1997 9:134-42.
- 30 3. Hamm, H. E. 1998. The many Faces of G protein signaling. J. Biol. Chem 1998 ,

273 : 669-672.

4. Tsien, R. Y. and A. Miyawaki. 1998. Seeing the machinery of live cells. Science 280:1954-1955.

5. Pollok, B. A. and R. Heim. 1999. Using GFP in FRET-based applications. Trends Cell Biol. 9:57-60.

6. Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien. 1997.

10

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、様々な疾患に対する薬剤スクリーニングの標的分子として重要な三量体型 G 蛋白質の GTP 結合型と GDP 結合型の量比を生細胞において測定することが可能となる。

15

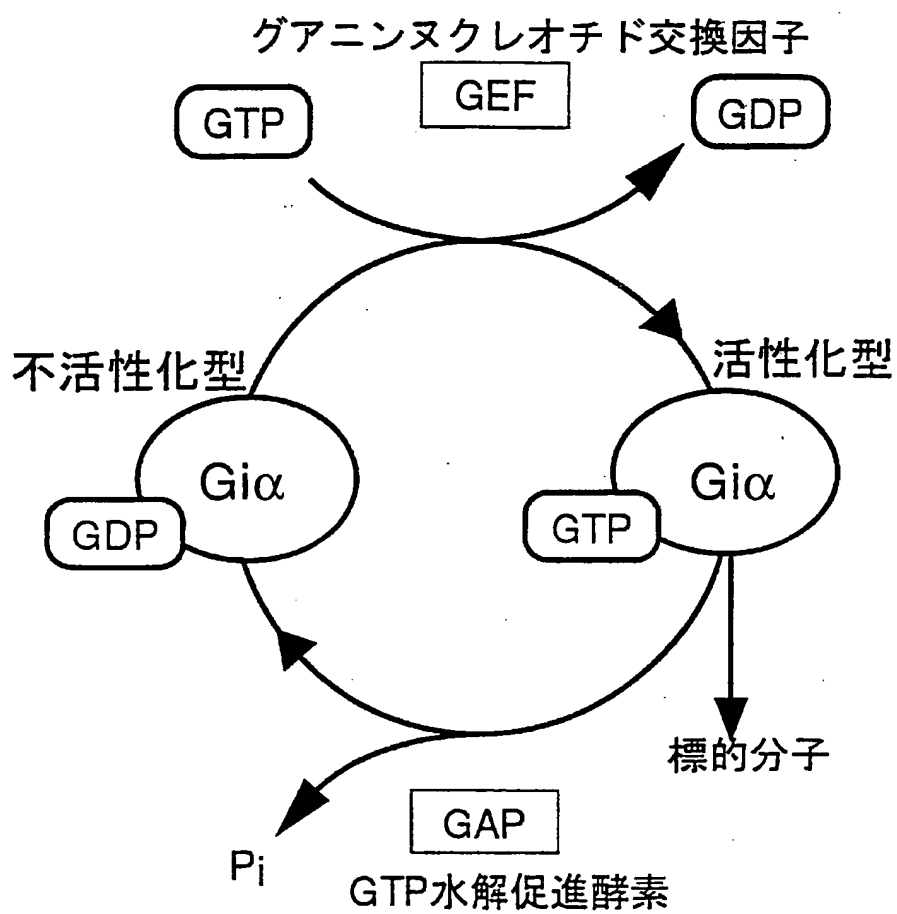
請求の範囲

1. 少なくとも以下の (a) ~ (d) のポリペプチド :
 - (a) 三量体型 G 蛋白質 α サブユニットの全部または一部のアミノ酸配列、もしくは
5 その変異アミノ酸配列を有するポリペプチド ;
 - (b) 活性化した三量体型 G 蛋白質 α サブユニットが結合する標的蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド ;
 - (c) 蛍光アクセプター蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド ; および
 - 10 (d) 蛍光ドナー蛋白質の全部または一部のアミノ酸配列、もしくはその変異アミノ酸配列を有するポリペプチド、
が連結した融合ポリペプチドである三量体型 G 蛋白質の活性モニター分子。
2. 連結したポリペプチド (a) - (b) の一端にポリペプチド (c) が、他端にポリペ
15 チド (d) が連結している請求項 1 の活性モニター分子。
3. 各ポリペプチド間の少なくとも一箇所がスパーサーペプチドを介して連結し
ている請求項 1 または 2 の活性モニター分子。
- 20 4. さらに以下のポリペプチド :
 - (e) 細胞内局在シグナルとして機能するポリペプチド
を連結している請求項 1、2 または 3 の活性モニター分子。
5. 蛍光アクセプター蛋白質および蛍光ドナー蛋白質が、それぞれ GFP アクセプ
25 ター蛋白質および GFP ドナー蛋白質である請求項 1 から 4 のいずれかの活性モニター分子。
6. 請求項 1 から 5 のいずれかの活性モニター分子をコードするポリヌクレオチ
ド。

7. 請求項6のポリヌクレオチドを保有するベクター。
8. 請求項6のポリヌクレオチドによる組換えプラスミドである請求項7のベクター。
- 5 9. 請求項6のポリヌクレオチドによる組換えウイルスである請求項7のベクター。
- 10 10. 請求項7から9のいずれかのベクターによる形質転換体であって、請求項1から5のいずれかの活性モニター分子を発現する形質転換細胞。
11. 請求項6のポリヌクレオチドをゲノムDNAに保有し、請求項1から5のいずれかの活性モニター分子を体細胞で発現するトランスジェニック動物。
- 15 12. 請求項1から5の活性モニター分子を細胞内に導入し、その活性モニター分子の発する蛍光を測定することを特徴とする三量体型G蛋白質の活性化測定方法。
13. 活性モニター分子が導入された細胞が、請求項10の性質転換細胞である請求項12の活性化測定方法。
- 20 14. 活性モニター分子が導入された細胞が、請求項11のトランスジェニック動物の細胞である請求項12の活性化測定方法。

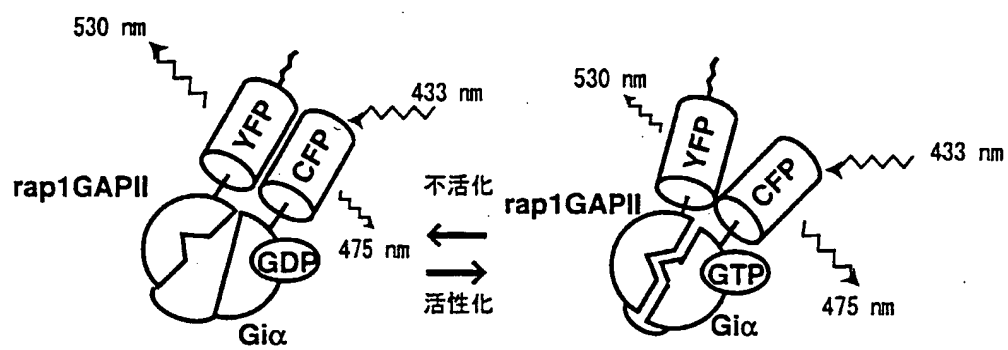
1 / 5

図 1



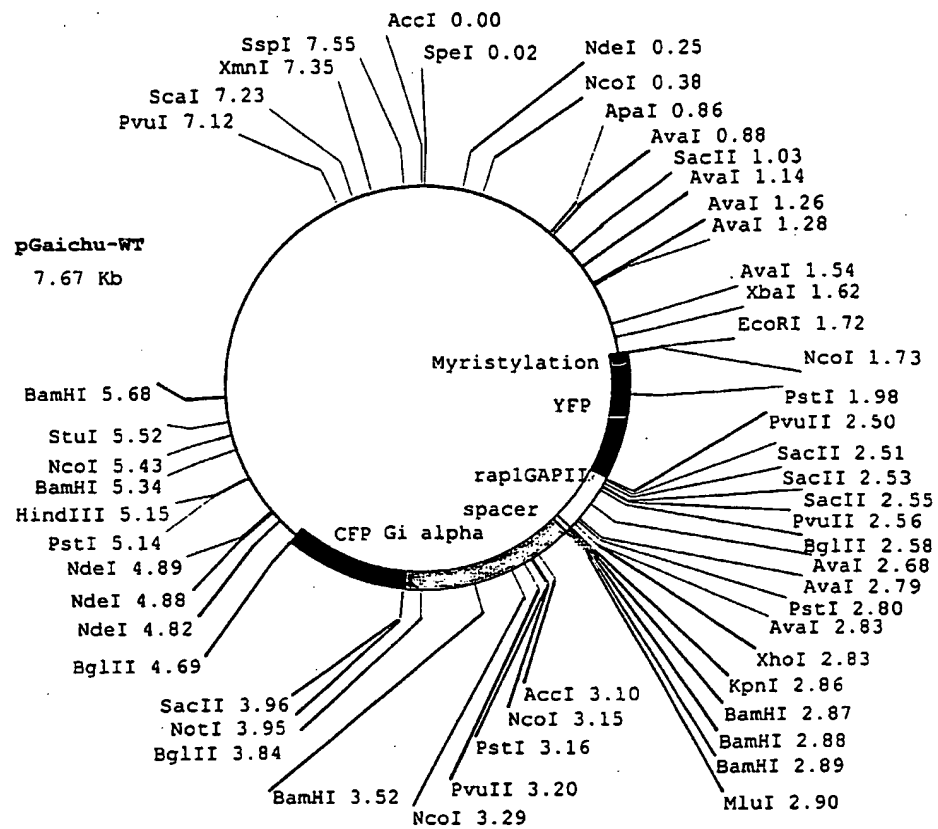
2 / 5

2



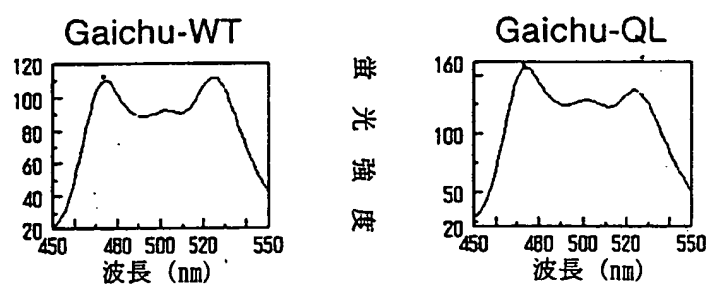
3 / 5

3



4 / 5

図 4



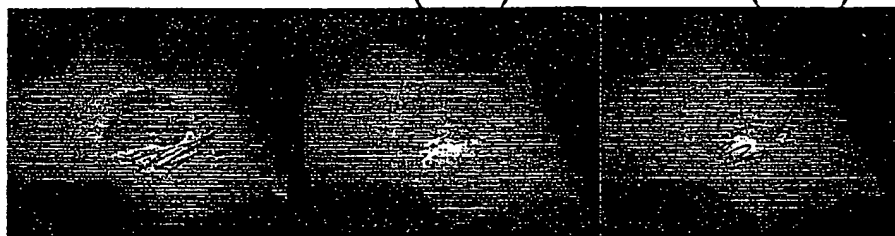
5 / 5

☒ 5

0

5 (分)

30 (分)



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A monitoring molecule for the activation of G protein

<130> 02-F-033PCT

<140>

<141>

<150> JP2001-218756

<151> 2001-07-18

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 1

ggtggcggat ccggtacgcg tgccgaggac aaggcggcag ccgag

45

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 2

gcggccgccc aagaggccac agtccttcag g

31

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 3

gtcgacatgg cacagctgcg gcccgcg

27

<210> 4

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 4

acgcgtaccg gatcgccac cggatcgcc accggatccg ccggtaccac ctccggagcc 60
tgtggggttg cactcgagct t 81

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 5

cgccagggtt ttcccagtca cgac

24

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 6

agcggataac aatttcacac aggaaac

27

<210> 7

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 7

ggcgaattcg ccatgggcag caacaagagc aagcccaagg acgccagcca gcggggcatg
gtgagcaagg gcgag

60

75

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 8

ggatccgcta cctcgagctt gtacagctcg tccatg

36

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 9

gcggccgcat ggtgagcaag ggcgaggagc

30

<210> 10

<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized Oligonucleotide

<400> 10
agatctacag ctcgtccatg ccgagag

27

<210> 11
<211> 7669
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Chimeric
sequence comprising ECFP, rap1GAP11, Gai2 and EYFP

<220>
<221> CDS
<222> (1728).. (4688)

<400> 11
gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60
gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120
ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggtt aactgcccac ttggcagtac 240
atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccc 300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360
tattagtcac cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc 420
atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgtgca 480
gcgatggggg cggggggggg gggggcgccg gccagggcgg gcggggcggg ggcgagggcg 540

ggcgggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagt 600
tccttttatg gcgaggcggc ggcgggcggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc 660
gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgc 720
ccggctctga ctgaccgct tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc ctctcctcc 780
gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag 840
ccttaaaggc ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg 900
tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgc gccgcgctg cccggcggt gtgagcgctg 960
cgggcgcggc ggggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc gccgggggc 1020
ggtgccccgc ggtgcggggg ggtgcgagc ggaacaaagg ctgcgtgcgc ggtgtgtgcg 1080
tggggggtg agcaggggt gtgggcgcgc cgtcgggt gtaaccccc cctgcacccc 1140
cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgc ggtcctgcgc gggcggtgc 1200
gcggggctcg ccgtgccggc cgggggtgg cggcaggtag ggtgccggc cggggcgggg 1260
ccgcctcggc cgggggagg ctcgggggag gggcgcggc gccccggagc gccggcggt 1320
gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg 1380
gacttccttt gtcccaaac tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcacccctc 1440
tagcggcgcg ggcgaagcg gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatggcgcg ggaggcctt 1500
cgtgcgtgc cgcgcccg tccccttc ctctccagc ctcggggtc ccgcagggg 1560
acggctgcct tcggggggga cggggcagg cggggttcg ctctggcgt gtgaccggcg 1620
gctctagagc ctctgtaac catgttcatg ccttcttctt tttctacag ctctgggca 1680
acgtgctggt tgttgtctg tctcatcatt ttggcaaaga attcgcc atg ggc agc 1736
Met Gly Ser
1
aac aag agc aag ccc aag gac gcc agc cag cgg ggc atg gtg agc aag 1784

Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Gly Met Val Ser Lys	
5 10 15	
ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac	1832
Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp	
20 25 30 35	
ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc	1880
Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly	
40 45 50	
gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc	1928
Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly	
55 60 65	
aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc	1976
Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly	
70 75 80	
ctg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc	2024
Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe	
85 90 95	
ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc	2072
Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe	
100 105 110 115	
ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag	2120
Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu	
120 125 130	
ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag	2168
Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys	
135 140 145	
gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc	2216
Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser	
150 155 160	
cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg	2264
His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val	
165 170 175	

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc	2312
Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala	
180 185 190 195	
gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg	2360
Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu	
200 205 210	
ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc	2408
Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro	
215 220 225	
aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc	2456
Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala	
230 235 240	
ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag gtc gag atg gca cag	2504
Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Glu Met Ala Gln	
245 250 255	
ctg cgg ccc gcg gtg cca ccc ggc cgt ccg cgg agg ggc tcg ctg ccc	2552
Leu Arg Pro Ala Val Pro Pro Gly Arg Pro Arg Arg Gly Ser Leu Pro	
260 265 270 275	
gcg ggg gcc agc tgg cac aac aca gat cta ttt gag atg att gag aag	2600
Ala Gly Ala Ser Trp His Asn Thr Asp Leu Phe Glu Met Ile Glu Lys	
280 285 290	
atg cag gga agc agg atg gat gaa caa cgc tgc tcc ttc ccg ccg ccc	2648
Met Gln Gly Ser Arg Met Asp Glu Gln Arg Cys Ser Phe Pro Pro Pro	
295 300 305	
ctc aaa aca gag gag gac tac att cca tac ccg agc gtg cac gag gtc	2696
Leu Lys Thr Glu Glu Asp Tyr Ile Pro Tyr Pro Ser Val His Glu Val	
310 315 320	
ttg ggg cga gaa gga ccc ttc ccc ctc atc ctg ctg ccc cag ttt ggg	2744
Leu Gly Arg Glu Gly Pro Phe Pro Leu Ile Leu Leu Pro Gln Phe Gly	
325 330 335	
ggc tac tgg att gag ggc acc aac cac gaa atc acc agc atc ccc gag	2792
Gly Tyr Trp Ile Glu Gly Thr Asn His Glu Ile Thr Ser Ile Pro Glu	
340 345 350 355	

aca gag cca ctg cag tcg ccc aca acc aag gtg aag ctc gag tgc aac	2840
Thr Glu Pro Leu Gln Ser Pro Thr Thr Lys Val Lys Leu Glu Cys Asn	
360 365 370	
ccc aca ggc tcc gga ggt ggt acc ggc gga tcc ggt ggc gga tcc ggt	2888
Pro Thr Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly	
375 380 385	
ggc gga tcc ggt acg cgt gcc gag gac aag gcg gca gcc gag cgc tct	2936
Gly Gly Ser Gly Thr Arg Ala Glu Asp Lys Ala Ala Ala Glu Arg Ser	
390 395 400	
aag atg atc gac aag aac ctg cgg gag gac ggc gag aag gcg gca cgg	2984
Lys Met Ile Asp Lys Asn Leu Arg Glu Asp Gly Glu Lys Ala Ala Arg	
405 410 415	
gag gtg aag ttg ctt ctg tta ggt gct gga gaa tca ggg aag agc acc	3032
Glu Val Lys Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr	
420 425 430 435	
atc gtc aag cag atg aag atc atc cac gag gat ggc tac tca gag gag	3080
Ile Val Lys Gln Met Lys Ile Ile His Glu Asp Gly Tyr Ser Glu Glu	
440 445 450	
gag tgc cgg cag tac cgt gcg gtt gtc tac agc aac acc atc cag tct	3128
Glu Cys Arg Gln Tyr Arg Ala Val Val Tyr Ser Asn Thr Ile Gln Ser	
455 460 465	
atc atg gcc atc gtc aaa gcc atg ggc aac ctg cag atc gac ttt gct	3176
Ile Met Ala Ile Val Lys Ala Met Gly Asn Leu Gln Ile Asp Phe Ala	
470 475 480	
gac ccc cag cgt gcg gat gat gcc agg cag ctg ttc gca ctg tcc tgt	3224
Asp Pro Gln Arg Ala Asp Asp Ala Arg Gln Leu Phe Ala Leu Ser Cys	
485 490 495	
gct gcc gag gag caa ggc atg ctt ccg gaa gac ctg tcg ggc gtc atc	3272
Ala Ala Glu Glu Gln Gly Met Leu Pro Glu Asp Leu Ser Gly Val Ile	
500 505 510 515	
cgg agg ctc tgg gct gac cat ggt gtg caa gcc tgc ttt ggc cgc tca	3320
Arg Arg Leu Trp Ala Asp His Gly Val Gln Ala Cys Phe Gly Arg Ser	

9/17

520	525	530	
cgg gaa tat caa ctc aat gac tca gcc gct tac tac ctg aat gac ctg			3368
Arg Glu Tyr Gln Leu Asn Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Leu Asn Asp Leu			
535	540	545	
gag cgc ata gca cag agt gac tat atc cct aca cag cag gat gtg ctg			3416
Glu Arg Ile Ala Gln Ser Asp Tyr Ile Pro Thr Gln Gln Asp Val Leu			
550	555	560	
cgg acc cgt gtg aag acc aca ggc atc gtc gaa aca cac ttc acc ttc			3464
Arg Thr Arg Val Lys Thr Thr Gly Ile Val Glu Thr His Phe Thr Phe			
565	570	575	
aag gac tta cac ttc aag atg ttt gat gtg ggt ggt cag cga tct gag			3512
Lys Asp Leu His Phe Lys Met Phe Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Glu			
580	585	590	595
cgg aag aag tgg atc cac tgc ttt gag ggt gtc acg gcc atc atc ttc			3560
Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala Ile Ile Phe			
600	605	610	
tgt gtc gcc ttg agc gcg tac gac ttg gtg ctg gct gag gat gag gag			3608
Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu Asp Glu Glu			
615	620	625	
atg aat cgc atg cat gag agc atg aag ctg ttt gat agc atc tgc aat			3656
Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser Ile Cys Asn			
630	635	640	
aat aag tgg ttc aca gac acc tcc atc atc ctc ttc ctc aac aag aag			3704
Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Lys			
645	650	655	
gac ctg ttt gaa gag aag atc aca cag agc ccc ctg acc atc tgt ttc			3752
Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr Gln Ser Pro Leu Thr Ile Cys Phe			
660	665	670	675
cct gag tac aca ggg gcc aac aag tat gac gag gca gcc agc tac atc			3800
Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala Ser Tyr Ile			
680	685	690	
cag agc aag ttt gag gac ctg aat aaa cgc aaa gac acc aag gag atc			3848

Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr Lys Glu Ile	
695 700 705	
tac acg cac ttc aca tgc gcc acc gac acc aag aac gtg cag ttt gtg	3896
Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val Gln Phe Val	
710 715 720	
ttt gat gcc gtc act gac gtc atc atc aag aac aac ctg aag gac tgt	3944
Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asp Cys	
725 730 735	
ggc ctc ttc ggc ggc cgc gga ggt agc ggt ggc atg gtg agc aag ggc	3992
Gly Leu Phe Gly Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Met Val Ser Lys Gly	
740 745 750 755	
gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc	4040
Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly	
760 765 770	
gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat	4088
Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp	
775 780 785	
gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag	4136
Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys	
790 795 800	
ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tgg ggc gtg	4184
Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val	
805 810 815	
cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc	4232
Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe	
820 825 830 835	
aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc	4280
Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe	
840 845 850	
aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc	4328
Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly	
855 860 865	

gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag 4376
 Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 870 875 880

gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac atc agc cac 4424
 Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Ile Ser His
 885 890 895

aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gcc aac 4472
 Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn
 900 905 910 915

ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac 4520
 Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp
 920 925 930

cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc 4568
 His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro
 935 940 945

gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac 4616
 Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn
 950 955 960

gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg 4664
 Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 965 970 975

atc act ctc ggc atg gac gag ctg tagatctttt tccctctgcc aaaaattatg 4718
 Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
 980 985

gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta ataaaggaaa tttattttca 4778

ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa 4838

atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt ggcaacatat gccatagtct 4898

ggctgccatg aacaaagggtg gctataaaga ggtcatcagt atatgaaaca gccccctgct 4958

gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgagggtt agattttttt ttatatatttg 5018

tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta aaattttcct tacatgtttt actagccaga 5078

tttttctcc tctcctgact actcccagtc atagctgtcc ctcttctctt atgaagatcc 5138
ctcgacctgc agcccaagct tggcgtaatc atggtcatac ctgtttcctg tgtgaaattg 5198
ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtga aagcctgggg 5258
tgcctaataa gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tcaactgccg ctttccagtc 5318
gggaaacctg tcgtgccagc ggatccgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccggcc 5378
ctaactccgc ccatcccggc cctaactccg ccagttccg ccatttctcc gcccattggc 5438
tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggcgcctt cggcctctga gctattccag 5498
aagtagtgag gaggcctttt tggaggccta ggcttttgca aaaagctaac ttgtttattg 5558
cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 5618
tttcaactga ttctagtgtt gggttgccta aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga 5678
tccgctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc 5738
ttccgcttcc tcgctcactg actcgtcgcg ctccgctggt cggctgcggc gagcggatc 5798
agctcactca aaggcggtaa tacggttacc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 5858
catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcgtt 5918
tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg 5978
gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcgc 6038
ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag 6098
cgtggcgtt tctcaatgct cagcgtgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 6158
caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctcgcct tatccggtaa 6218
ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 6278
taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggctgtaca gagttcttga agtgggtggc 6338

taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 6398
cttcggaaaa agagtiggta gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gtagcgggtg 6458
tttttttggt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggaatcctcaag aagatccttt 6518
gatcttttct acggggctcg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt 6578
catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta 6638
atcaatctaa agtatatatg agtaaaacttg gtcigacagt taccaatgct taatcagtg 6698
ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcattcata gtgcctgac tccccgtcgt 6758
gtagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgcctgaa tgataccgcg 6818
agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 6878
gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 6938
agctagagta agtagttcgc cagttaatag ttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 6998
catcgtgggt tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgac 7058
aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc 7118
gatcgttgct agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca 7178
taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac 7238
caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 7298
ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 7358
ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgt 7418
tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 7478
aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 7538
actcttccit tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcgata 7598
catatttgaa tgtatttga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa 7658

agtgccacct g

7669

<210> 12

<211> 987

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Chimeric
sequence comprising ECFP, rap1GAP11, Gai2 and EYFP

<400> 12

```

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Gly Met
 1           5           10           15
Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
          20           25           30
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
          35           40           45
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
          50           55           60
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
          65           70           75           80
Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
          85           90           95
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
          100          105          110
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
          115          120          125
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
          130          135          140
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
          145          150          155          160
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
          165          170          175
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
          180          185          190
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
          195          200          205
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser
          210          215          220
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
          225          230          235          240
Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Val Glu

```


Arg Ser Glu Arg Lys Lys Trp Ile His Cys Phe Glu Gly Val Thr Ala
 595 600 605
 Ile Ile Phe Cys Val Ala Leu Ser Ala Tyr Asp Leu Val Leu Ala Glu
 610 615 620
 Asp Glu Glu Met Asn Arg Met His Glu Ser Met Lys Leu Phe Asp Ser
 625 630 635 640
 Ile Cys Asn Asn Lys Trp Phe Thr Asp Thr Ser Ile Ile Leu Phe Leu
 645 650 655
 Asn Lys Lys Asp Leu Phe Glu Glu Lys Ile Thr Gln Ser Pro Leu Thr
 660 665 670
 Ile Cys Phe Pro Glu Tyr Thr Gly Ala Asn Lys Tyr Asp Glu Ala Ala
 675 680 685
 Ser Tyr Ile Gln Ser Lys Phe Glu Asp Leu Asn Lys Arg Lys Asp Thr
 690 695 700
 Lys Glu Ile Tyr Thr His Phe Thr Cys Ala Thr Asp Thr Lys Asn Val
 705 710 715 720
 Gln Phe Val Phe Asp Ala Val Thr Asp Val Ile Ile Lys Asn Asn Leu
 725 730 735
 Lys Asp Cys Gly Leu Phe Gly Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Met Val
 740 745 750
 Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu
 755 760 765
 Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 770 775 780
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr
 785 790 795 800
 Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr
 805 810 815
 Trp Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His
 820 825 830
 Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr
 835 840 845
 Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys
 850 855 860
 Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp
 865 870 875 880
 Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr
 885 890 895
 Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile
 900 905 910
 Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 915 920 925
 Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07270

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K19/00, C12N15/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10, C12Q1/02, A01K67/027, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K19/00, C12N15/00-15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/47557 A2 (Onyx Pharm Inc.), 23 September, 1999 (23.09.99), & AU 9931038 A & EP 1064373 A2 & JP 2002-509862 A	1-14
Y	Naoki MOCHIZUKI et al., Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1., NATURE, 28 June, 2001 (28.06.01), Vol.411, No.6841, pages 1065 to 1068	1-14
Y	WO 2001/34766 A2 (MATSUDA M), 17 May, 2001 (17.05.01), & AU 200132219 A & AU 200160625 A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 September, 2002 (25.09.02)

Date of mailing of the international search report
15 October, 2002 (15.10.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K19/00, C12N15/62, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12Q1/02,
A01K67/027, G01N33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K19/00, C12N15/00~15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 99/47557 A2 (ONYX PHARM INC.,) 1999.09.23 & AU 9931038 A & EP 1064373 A2 & JP 2002-509862 A	1-14
Y	Naoki MOCHIZUKI et al., Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1., NATURE, 28 JUNE 2001, Vol. 411. No. 6841, p. 1065-1068	1-14
Y	WO 2001/34766 A2 (MATSUDA M) 2001.05.17 & AU 200132219 A & AU 200160625 A	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.09.02

国際調査報告の発送日

15.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.